

**A miR-146a mikroRNS tumor-kialakítási szerepének  
és mechanizmusának vizsgálata**

**Tézis**

<b><i>Készítette:</i></b>	<b>Szenthe Kálmán</b>
<b><i>Témavezetők:</i></b>	<b>Dr. Minárovits János</b> <b>Dr. Salamon Dániel</b>
<b><i>Programvezető:</i></b>	<b>Prof. Dr. Erdei Anna</b>

## BEVEZETÉS

A gének kifejeződésének szabályozása a sejtek felépítéséhez és működéséhez elengedhetetlen fontosságú. Ez a folyamat több összehangolt szinten zajlik, első lépése a transzkripció szabályozás. A gerincesek esetében a promóterek transzkripció aktivitását meghatározó epigenetikai szabályozómechanizmusok közé sorolják a DNS metilációt, a hiszton módosításokat, valamint a nem transzlálódó kisRNS-ek által szabályozott bizonyos folyamatokat is. A reguláló folyamatok tárgyalásánál a transzkripció faktorok és az azokhoz tartozó jelátviteli útvonalak vizsgálata és ismerete is elengedhetetlen.

Az epigenetikai szabályozások olyan elsődleges, génaktivitást meghatározó folyamatok, melyek alapvetően szükségesek a sejtek megfelelő működéséhez, így megváltozásuk kóros, tumoros elváltozásokhoz vezethet. Munkám során az irodalmi adatok alapján egyes malignus daganatok kialakulását elősegítő, másokét gátló miR-146a humán mikroRNS génexpressziós szabályozásának epigenetikai és fehérje szintű vizsgálatát kívántam elvégezni, ily módon közelítve a feltételezett tumor-kialakítási szerep és mechanizmus jobb megértéséhez. A miR-146a fontos szerepet játszik az egészséges immunsejtekben lejátszódó folyamatokban, mennyiségi megváltozása számos kóros elváltozásban kimutatható, ez a változás a tumorkialakulási folyamatok indukáló lépése lehet. A miR-146a expresszió szabályozása az Epstein-Barr vírus által termelt egyik fehérje, az LMP1 által befolyásolt az NFkB jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg. A miR-146a által szabályozott fehérjék (TRAF6, IRAK1) ugyancsak ehhez a jelátviteli láncához tartoznak, így egy komplex, sok ponton összefüggő szabályozási rendszert alkotnak. Az NFkB-n kívül a c-Myc fehérje szabályozó hatását is feltételezik, melynek ugyancsak ismert az EBV-hez fűződő kapcsolata, így kísérleteimet EBV pozitív és negatív (LMP1 pozitív és negatív) epiteliális és B-sejtvonalakon végeztem.

Vizsgálataim szerint a miR-146a kifejeződését több epigenetikai mechanizmus komplex módon, együttesen szabályozza. Az eredményeim reményeim szerint segítséget nyújtanak a miR-146a esetleges tumorkialakítási mechanizmusainak és a tumorkialakulásban betöltött szerepének megértéséhez, melyek újabb lépcsőfokokat jelenthetnek a terápiás vagy megelőző célú módszerek alkalmazásához.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a miR-146a mikroRNS tumorkialakítási szerepének értékelése céljából a következő promóterszabályozási és irodalmi adatok jelentőségét értékelő vizsgálatokat végeztem el:

- (1) a miR-146a promóter aktivitásának jellemzése, a prekursor és érett miR-146a formák kimutatása EBV pozitív sejtvonalakban,
- (2) a DNS metiláció szerepének és jelentőségének meghatározása a promóter szabályozásában, együtt értékelve a szakirodalmi adatokkal,
- (3) a miR-146a gén három különböző régióját érintő aktiváló hisztonmodifikációk szerepének meghatározása a promóter aktivitásának szabályozásában,
- (4) a DNS metiláció és a vizsgált hisztonmodifikációk együttes szabályozási szerepének értékelése a promóter aktivitásra,
- (5) az *in silico* módszerrel valószínűsített transzkripció faktor kötések vizsgálata *in vivo* módszerrel a promóter területén,
- (6) az EBV szerepének értékelése a miR-146a transzkripció szabályozásában,
- (7) a DNS metiláció hatásának értékelése a c-Myc és NFkB faktorok kötőhelyén és jelentősége a miR-146a promóter aktivitásának szabályozásában.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Sejtvonalak

Munkám során EBV pozitív és negatív (LMP1 pozitív és negatív) epiteliális és B-sejtvonalakat használtam, melyek jó modellrendszerek a szervezetben lefutó tumorképződési és fennmaradási mechanizmusok vizsgálatára.

### Kontroll szekvenálás

A célul kitűzött vizsgálatok elvégzéséhez elengedhetetlen a gén vizsgált régióinak pontos szekvencia-meghatározása, így elvégeztem a sejtvonalankénti esetleges eltérések szekvenálás segítségével való kimutatását.

### Expressziós vizsgálatok

A vizsgálatokat két céllal végeztem:

- prekursor és érett miR-146a formák kimutatása EBV pozitív és EBV negatív sejtvonalakon,

- a miR-146a promóter aktivitás összehasonlítása a vizsgált sejtvonalakban, ami alapvető az egyes epigenetikai szabályozó mechanizmusok jelentőségének értékeléséhez.

Módszerek:

- Nuclear „run-on” módszer és az azt követő real-time PCR segítségével meghatároztam az elsődleges átirat mennyiségét. A módszert változtatásokkal Patrone és mtsai. (2000) által közölt módon végeztem, módosításokkal.
- Northern-blot segítségével meghatároztam az érett alak mennyiségét. A módszert Szittyai és mtsai. (2002) és Csorba és mtsai. (2007) alapján végeztem, kiegészítésekkel.

#### DNS metiláció vizsgálata

Biszulfít kezelés és azt követő direkt szekvenálás segítségével vizsgáltam a promóter régió CpG dinukleotidjainak metiláltságát. A modifikálási reakciót kisebb módosításokkal a Frommer és mtsai. (1992) illetve Clark és mtsai. (1994) által leírt módon végeztem.

#### Hisztón modifikációk vizsgálata

Kromatin immunprecipitációval és azt követő real-time PCR-rel vizsgáltam a hármas és négyes hisztón acetilációjának, valamint a hármas hisztón négyesszámú lizin oldallánc-metilációjának mértékét a gén három régióján. A Kromatin Immunprecipitációt kisebb módosításokkal a Farnham és mtsai. (2002) által közölt metodika alapján végeztem.

#### DMS *in vivo* footprinting

DMS kezelés és azt követő ligáció mediálta PCR, valamint szekvenálás segítségével a fehérje-DNS kapcsolatokat vizsgáltam. A módszert a már korábban leírt módon (Mueller és Wold, 1989, Garrity és Wold, 1992) kisebb módosításokkal (Niller és mtsai., 1995, Szenthe és mtsai, 2013c) végeztem el.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A miR-146a humán mikroRNS tumor-kialakítási szerepének és mechanizmusának megértéséhez a mennyiségi viszonyait befolyásoló mechanizmusok ismerete elengedhetetlen. Vizsgálataim során a következő megállapításokra jutottam:

- a miR-146a promóter aktivitását jobban tükrözi az újonnan képződő átírat (prekursor RNS) mennyisége, mint az érett miR-146a alaké,
- A DNS metiláció hiánya önmagában nem elégséges a promóter bekapcsolásához, hiszen az inaktív promóterű sejtvonalaknál csak két esetben figyelhattunk meg teljes metilációt, a többi sejtvonalnál közepes mértékű, vagy egy esetben egyáltalán nem tartalmazott metilált CpG dinukleotidokat a szabályozó régió.
- Az aktív promóterű sejtvonalak minden esetben metilálatlan promótert tartalmaztak.
- A vizsgált hisztonmodifikációk közepes vagy jelentős mértékben voltak jelen az aktív promóterű sejtvonalak esetében, elsősorban a szabályozó régió és az első intron területén, ezzel szemben az inaktív sejtvonalaknál kismértékben vagy egyáltalán nem lehetett a jelenlétüket kimutatni.
- A DNS metiláció és a hisztonmodifikációk kapcsolataként elmondhatjuk, hogy az aktiváló modifikációk szinte teljesen hiányoztak a hipermetilált, inaktív miR-146a promóterekkel jellemezhető BL sejtvonalakban, és szintjük alacsony volt az epitheliális sejtvonalakban, melyeket változó szintű promóter metiláció jellemezett.
- A miR-146a promóter területén *in silico* kimutatott faktorkötőhelyek *in vivo* vizsgálata eredményeként kimondhatjuk, hogy a kiválasztott sejtvonalak esetében a c-Ets, c-Myc és NFkB kötések a miR-146a-t expresszáló BL sejtvonalban és az expressziót nem mutató epitheliális sejtvonalban voltak kimutathatók, ezzel szemben az inaktív BL sejtvonal egyik faktor kötődését sem mutatta.
- A BL sejtvonalak faktorkötése jó összefüggést mutatott a promóter aktivitással, miközben az epitheliális sejtvonal esetében más faktorok vagy modifikációk hiányának túlsúlya okozhatja a régió inaktivitását.
- A PU.1 faktor kötése nem volt kimutatható az általam vizsgált sejtvonalak egyikében sem.

- A szakirodalmi adatok alapján az aktivitás szabályozásában fontosnak vélt két faktor jelentőségéről kimondhatjuk, hogy a c-Myc és az NFkB is metiláció érzékeny kötődéssel rendelkezik. A c-Myc esetében az általam használt minden sejtvonal esetében metilálatlannak adódott a kötőhely (egy esetben nagyon gyenge metiláció volt megfigyelhető), így a kötődést elvileg létre tud jönni. Elképzelhető, hogy a miR-146a-t nem expresszáló BL sejtvonalaknál a promóter régió represszív kromatin szerkezete gátolhatja a c-Myc kötődését.
- Az NFkB kötődés esetében a c-Myc esetében leírottakhoz hasonló összefüggések figyelhetők meg, az inaktív promóterű Rael és Akata sejtvonalak kivételével, melyeknél erőteljes kötőhelyi metiláció gátolhatja a faktor kapcsolódását.
- Az összefüggések értékelésénél fontos a sejtvonal LMP1 pozitivitása, mivel az növeli az NFkB mennyiségét. Bizonyos EBV negatív sejtvonalakban az LMP1 hiányában is megfigyelhetünk erőteljes vagy közepes mértékű miR-146a expressziót, ez az egyéb aktiváló faktorok, mechanizmusok fontosságát jelzi.
- BJAB sejtvonal vizsgálata azt mutatja, hogy EBV negatív sejtben és alacsony NFkB szint esetén is előfordulhat erőteljes miR-146a promóter aktivitás.
- A C666-1 epitheliális sejtvonal analízise arra utal, hogy NFkB kötődése a miR-146a gén szabályozó régiójához nem elegendő a miR-146a promóter aktiválásához.

## A DOKTORI DOLGOZAT ÉS A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

Szenthe K, Koroknai A, Banati F, Bathori Z, Losza R, Burgyan J, Wolf H, Salamon D, Nagy K, Niller HH, Minarovits J. (2013). **The 5' regulatory sequences of active miR-146a promoters are hypomethylated and associated with euchromatic histone modification marks in B lymphoid cells.** Biochem Biophys Res Commun. 433(4):489-95

Szenthe K, Nagy K, Buzas K, Niller HH, Minarovits J. (2013). **MicroRNAs as targets and tools in B-cell lymphoma therapy.** Journal of Cancer Therapy 4:466-474. DOI:10.4236/jct.2013.43A057

## EGYÉB TÉMÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNY ÉS ELŐADÁSOK ABSZTRAKTJAI

Szenthe K, Koroknai A, Banati F, Bathori Z, Helmut Niller H, Wolf H, Nagy N, Klein E, Minarovits J, Salamon D. (2013). **The role of DNA hypomethylation, histone acetylation and in vivo protein-DNA binding in Epstein-Barr virus-induced CD23 upregulation.** Biochem Biophys Res Commun. 435(1):8-15. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.127.

Szenthe K, Bakos K, Bánáti F, Koroknai A, Niller HH, Minárovits J. (2011). **High resolution methylation analysis of the human CD40 promoter in Epstein-Barr virus (EBV) positive and negative cell lines.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 58:(Suppl.) pp. 223-224.

Szenthe K, Koroknai A, Bánáti F, Báthori Z, Niller HH, Salamon D, Minárovits J. (2011). **Epigenetic regulation of the human micro RNA miR-146a in EBV positive and negative cell lines.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 58:(Suppl.) p. 102. 1 p.

## EGYÉB REFERENCIÁK

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. (1994). **High sensitivity mapping of methylated cytosines.** Nucl. Acids Res. 22:2990-2997.

Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyán J. (2007). **The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both siRNA and miRNA mediated pathways.** J. Virol. 81, 11768–11780.

Farnham P. (2002). **Chromatin Immunoprecipitation (ChIPs) protocol (Farnham Lab).** <http://mcardle.oncology.wisc.edu/farnham/protocols/chips.html>.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. (1992). **A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831.

Garrity PA, Wold BJ. (1992). **Effects of different DNA polymerases in ligation-mediated PCR: Enhanced genomic sequencing and *in vivo* footprinting.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1021-1025.

Mueller PR, Wold B. (1989). ***In vivo* footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR.** Science 246:780-786.

Niller HH, Glaser G, Knüchel R, Wolf H. (1995). **Nucleoprotein complexes and DNA 5'-ends at oriP of Epstein-Barr virus.** J. Biol. Chem. 270:12864-12868.

Szittyá G, Molnár A, Silhavy D, Hornyik C, Burgyán J. (2002). **Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus.** Plant Cell, 14(2):359-72.